

骨质疏松绵羊模型松质骨及皮质骨的微观结构及力学性能变化的研究

吴子祥 雷伟 胡蕴玉 王海强 万世勇 王军 刘绪立 李波 付索超

摘要：目的 观察去势手术对绵羊皮质骨和松质骨的骨密度、骨小梁结构及力学性能的影响。方法 20 只雌性成年绵羊(4 ± 1.5)随机分为去势 4 个月组(OVX-4months)(4 只)、去势 12 个月组(OVX-12months)(8 只)和假手术(Sham)(8 只)。OVX 组行双侧卵巢切除术,假手术组仅显露双侧卵巢,术中测定腰椎骨密度。分别与术后 4、12 个月处死动物,测定股骨颈、股骨干及股骨髁的骨密度,并行 MicroCT 分析及生物力学测试。结果 去势 12 个月后(OVX-12months)组腰椎、股骨颈及股骨髁的骨密度较对照组显著降低,而皮质骨骨密度无明显降低。其松质骨的相对骨体积(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数目(Tb.N)较对照组显著降低,表面积体积比(BS/BV)、骨小梁间隙(Tb.Sp)则较对照显著增高。生物力学测试表明,去势 12 个月后,腰椎松质骨的最大压缩应力分别较 Sham 组和 OVX-12months 组下降 82.5% 和 85.9% ,力学强度显著下降,而皮质骨的力学强度无显著变化。结论 去势 12 个月后,绵羊腰椎、股骨部的松质骨 BMD 及骨小梁空间结构参数明显降低,力学强度也显著下降,可以作为骨质疏松的大动物模型。而皮质骨的骨密度和力学强度下降不明显,需要更长的去势时间。

关键词：骨质疏松；动物模型；骨密度；显微 CT；生物力学

The trabecular and cortical bone difference in ovariectomized sheep : a densitometric , histomorphometric and biomechanical study WU Zixiang , LEI Wei , HU Yunyu , WANG Haiqiang , WAN Shiyong , WANG Jun , LIU Xuli , LI Bo , FU Suochao . Xijing Hospital , Xi'an 710032 , China

Abstract : Objective To observe the trabecular and cortical bone changes in ovariectomized (OVX) sheep. **Methods** 20 adult sheep were randomly divided into three groups : sham-operated group(Sham , 8 sheep) , OVX-Month 4 group($n = 4$) and OVX-Month 12 group($n = 8$). At the time of operation , all sheep underwent dual energy x-ray absorptiometry (DXA) of the lumbar vertebrae . Sheep were sacrificed 4 months and 12 months after operation respectively , and BMD at lumbar spine , femoral neck , femoral shaft and femoral condyle was measured using DXA . The trabecular bone (spine , femoral neck and condyle) and cortical bone (femoral shaft) were harvested and for micro-CT scanning . Compression test was performed for trabecular bone , while the 3-point bending test was conducted for cortical bone . **Results** After OVX for 12 months , the BMD in trabecular bone was significantly lower than that of Sham group and OVX-Month 4 group ($P < 0.01$). The BS/BV , Tb.Th and Tb.N was significantly lower while the Tb.N and BVF was significantly higher ($P < 0.01$ for both) compared with OVX-Month 12 group and Sham controls . The maximum compressive strength of trabecular bone in OVX-Month 12 group was significantly lower than that of the other two groups ($P < 0.01$). 3-point bending test for cortical bone showed no difference among 3 groups . **Conclusion** BMD , micro-architecture and biomechanical properties of the trabecular bone decreased significantly after OVX for 12 months . OVX sheep was a suitable animal model for studying estrogen depletion osteoporosis .

Key words : Osteoporosis ; Animal model ; Bone mineral density ; MircoCT ; Biomechanical test

绝经后骨质疏松(Osteoporosis ,OP)发病率高,患者常伴有骨折发生,而目前骨科领域的传统内固定研发均以正常人体骨骼为标准,将其应用在 OP 骨折中具有局限性,可导致内固定松动失败。因此,选

作者单位：710032 西安,第四军医大学西京医院全军骨科研究所

通讯作者：胡蕴玉,Email :wuzixiang@hotmail.com

用合适的动物模型成为改进内固定设计、研发防治 OP 药物必不可少的手段。在现有的可供选择的模型动物中,绵羊体型较大,适合进行内固定研究。文献报道^[1],在切除卵巢(Ovariectomy, OVX)后可以出现类似人类绝经后的各种代谢变化,特别是骨组织对雌激素水平下降出现的反应。因此,选用绵羊作为 OP 的动物模型成为国内外近年来的研究趋势。目前国外 OP 方面的前沿研究已开始采用显微 CT (MicroCT)来观察骨质变化,从骨小梁水平上评价骨质的结构及功能。但由于国外采用的实验动物与国内种属不同,骨质量差异很大^[2],而国内为数不多的动物模型研究^[3-6]均存在样本量小、观察时间短的缺点,并且仅限于双能 X 线骨密度检测和二维平面的骨计量学分析,尚无涉及骨小梁三维微观结构的研究,因此难以为 OP 相关研究提供足够的研究基础。本研究采用国内北方最常见的小尾寒羊为研究对象,应用骨密度扫描、显微 CT 分析及生物力学测试的方法,分别观察去势 4 个月、12 个月的绵羊皮质骨及松质骨的骨密度(Bone mineral density, BMD)、骨小梁三维微观结构及力学性能的改变,为绵羊作为 OP 的实验模型提供更多实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选用 20 只平均年龄为(4 ± 1.5)岁和平均体重为(39 ± 2)kg 健康成年雌性的绵羊(小尾寒羊)随机分为 OVX 组(12 只)和 Sham 组(8 只)。OVX 组中动物随机分为 A 组(4 只)和 B 组(8 只),观察时间分别为 4 个月和 12 个月。

1.2 实验方法

在无菌条件下,用动物专用麻醉药 846 肌注麻醉(中国人民解放军农牧大学军事兽医研究所研制)经腹腔切除去势组绵羊双侧卵巢,假手术组仅显露双侧卵巢。术后动物取俯卧位,测量腰椎骨密度。4 个月后,处死 OVX-4months 组的 4 只绵羊,对其腰椎、股骨颈、股骨干及股骨髁等 4 个研究部位进行 BMD 检查、MicroCT 分析及生物力学测试。12 个月后处死所有动物,同样对上述研究部位进行 BMD 检查、MicroCT 分析及生物力学测试。所有动物均在相同条件下以草料进行饲养(在第四军医大学实验动物中心指导下进行饲养动物)。

1.2.1 BMD 检查方法:腰椎 BMD 检查:测量腰椎 BMD 时,绵羊取俯卧位。采用双能 X 线吸收骨密度仪(Lunar Corp. Madison, WI, USA),以脊柱正位测

量模式(AP Spine Bone Density Analysis)测定 $L_3 \sim L_6$ 椎体 BMD,取整体的平均值为腰椎 BMD。所有动物接受 2 次 BMD 检测(去势手术前及完成观察处死动物后),以自身前后对照的形式观察 BMD 下降情况。

股骨颈、股骨髁及股骨干的 BMD 检查:处死绵羊后,取下双侧股骨,剔除周围软组织。将股骨置于正位进行扫描,采用手动分析模式测定股骨颈、股骨干及股骨髁相应感兴趣区域(ROI)的 BMD。测量股骨颈时,选取测量区域与人类检查相同;测量股骨干及股骨髁 BMD 时,选取同等大小的测量区域进行检查,以消除动物股骨之间大小的不同,保证组间具有可比性。选择测量 ROI 区域见图 1。

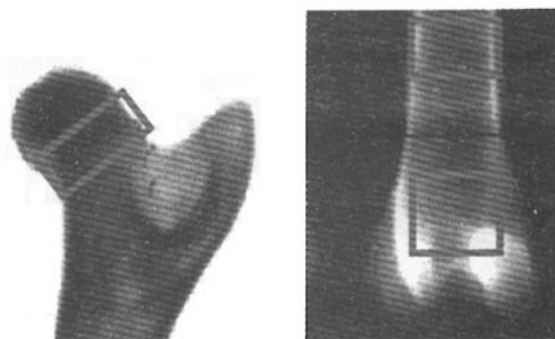


图 1 测定 BMD 时所选择的股骨颈、股骨干及股骨髁的感兴趣区域(ROI)

1.2.2 MicroCT 扫描与重建分析:采用直径 1.5 cm 的环钻,钻取绵羊 $L_3 \sim L_6$ 椎体松质骨,保证钻取每节椎体相同的部位。去除上下终板,制成圆柱状标本。采用电锯截取股骨颈和股骨干标本。分别将标本放入 MicroCT(eXplore Locus SP, GE Healthcare, U. S. A.)样本杯中,在相同的条件下进行三维 CT 扫描重建,扫描分辨率 21 μm 。扫描结束后,采用 GE 公司的配套软件分析其骨小梁三维微观结构并采集骨小梁的空间结构参数。取位于标本中心位置的同样体积的 ROI 进行骨小梁结构分析,取左右两侧的平均值或 $L_3 \sim L_6$ 的均值为测量结果。

1.2.3 生物力学测试:在万能材料试验机上(MTS 858 System Inc, Minneapolis, U. S. A.),采用轴向加压测试椎体及股骨髁部松质骨的力学强度。用电锯将股骨髁截取为长方体。测量时,将圆柱形的椎体骨块及长方体型的股骨髁骨块置于加压模具之间,以 $5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度逐渐施加轴向压力,直到骨质出现压缩骨折。实验时,用生理盐水保持标本处于湿润状态。根据软件采集的压力-应变曲线,取曲线

达到的峰值为松质骨最大抗压载荷 ,曲线下面积为能量吸收值 ,曲线在直线上升阶段的斜率为骨质的弹性模量(E),最大应力(σ_{ult})= 最大压力/体表面积^[7]。

采用 3 点弯曲试验测量皮质骨的力学强度。测量时 ,将股骨干放置于 3 点弯曲测试模具上 ,承载支点间间距为 26 mm ,以 1 mm·min⁻¹ 的速度逐渐施加压力 ,直至标本发生断裂^[2]。取压力曲线达到的峰值为皮质骨最大抗压载荷。

1.3 测量结果

术后进行大体的密切观察 ,观察术后动物饮食、活动及切口愈合情况 ,注意有无炎性反应。BMD 分析指标 :BMD、BMC 及 BMC/W ;显微 CT 分析指标 :骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁间隙(Tb.Sp)、相对骨体积(BV/TV)、表面积体积比(BS/BV)及骨体积分数(BVF) ;生物力学分析指标 :松质骨 轴向抗压强度 ,皮质骨 :三点弯曲强度。

2 统计学处理

测定指标采用均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$) ,组间差异采用 SPSS 11.0 行方差分析 ,选用 $P < 0.05$ 为统计学显著性界值。

3 结果

3.1 大体观察

术后所有动物手术切口出现不同程度的肿胀 ,2~4 d后消失 ,切口愈合良好。动物没有出现切口感染 ,活动、进食情况基本正常。

3.2 骨密度检查结果(见表 1)

表 1 去势前后绵羊腰椎、股骨颈及股骨髁部 BMD

组别	腰椎 BMD(g/cm ²)		股骨颈 BMD (g/cm ²)	股骨髁 BMD (g/cm ²)
	手术前	手术后		
Sham($n = 8$)	1.15 ± 0.17	1.22 ± 0.07	1.01 ± 0.14	1.48 ± 0.10
OVX-4months($n = 4$)	1.26 ± 0.08	1.28 ± 0.06	0.89 ± 0.04	1.36 ± 0.10
OVX-12months($n = 8$)	1.11 ± 0.10	0.86 ± 0.09	0.63 ± 0.12	0.96 ± 0.11

3.3 MicroCT 三维重建结果(见表 2、表 3)

表 2 去势前后绵羊腰椎、股骨颈的空间结构参数

组别	Tb.Th(mm)	Tb.N(1/mm)	Tb.Sp(mm)	BS/BV(%)	BV/TV(%)
腰椎					
Sham($n = 8$)	0.60 ± 0.08	2.20 ± 0.23	0.27 ± 0.07	5.81 ± 0.91	66.37 ± 5.91
OVX-4months($n = 4$)	0.56 ± 0.09	2.04 ± 0.15	0.29 ± 0.09	6.33 ± 1.57	59.18 ± 18.29
OVX-12months($n = 8$)	0.48 ± 0.09	1.92 ± 0.22	0.31 ± 0.09	7.72 ± 2.04	56.34 ± 7.42
股骨颈					
Sham($n = 8$)	0.48 ± 0.08	1.96 ± 0.17	0.28 ± 0.07	7.02 ± 1.71	65.35 ± 8.95
OVX-4months($n = 4$)	0.46 ± 0.13	1.83 ± 0.20	0.36 ± 0.08	8.63 ± 2.07	51.59 ± 14.06
OVX-12months($n = 8$)	0.30 ± 0.08	1.68 ± 0.15	0.39 ± 0.13	10.68 ± 1.70	38.16 ± 12.54

表 3 去势前后绵羊股骨干皮质骨的平均厚度及骨密度

组别	平均厚度(mm)	股骨干 BMD(g/cm ²)
Sham($n = 8$)	1.90 ± 0.08	0.91 ± 0.04
OVX-4months($n = 4$)	1.85 ± 0.05	1.00 ± 0.08
OVX-12months($n = 8$)	1.78 ± 0.05	0.93 ± 0.05

3.4 生物力学研究结果(见表 4、表 5)

表 4 腰椎椎体及股骨髁最大压缩应力

组别	最大压缩应力(MPa)
腰椎椎体	
Sham($n = 8$)	9.69 ± 2.07
OVX-4months($n = 4$)	9.87 ± 0.59
OVX-12months($n = 8$)	5.31 ± 2.00
股骨髁	
Sham($n = 8$)	9.09 ± 2.21
OVX-4months($n = 4$)	9.58 ± 0.89
OVX-12months($n = 8$)	5.26 ± 2.85

表 5 皮质骨的最大抗弯曲载荷

组别	最大抗弯曲载荷(N)
Sham($n = 8$)	2 925 ± 414
OVX-4months($n = 4$)	2 982 ± 261
OVX-12months($n = 8$)	2 580 ± 469

统计结果显示 ,去势 12 个月后 ,腰椎椎体、股骨颈及股骨髁的 BMD 较假手术组(Sham)和去势 4 个月组(OVX-4months)有显著降低(P 值均小于 0.01) ,而股骨干的 BMD 与对照组差异无显著性($P > 0.05$)。通过动物去势前后的 BMD 自身比较也发现 ,去势 12 个月后 ,腰椎 BMD 较去势前降低 22.5% ,而对照组则未发现降低。MicroCT 分析结果表明 ,去势 12 个月后 ,绵羊腰椎及股骨颈松质骨的骨小梁厚度、骨小梁数目及骨体积分数较对照组显著降低(P 值均小于 0.05) ,表面积体积比、骨小梁间隙则较假手术组显著增高(P 值均小于 0.05)。生物力学研究测试显示 ,去势 12 个月以后 ,松质骨的轴向抗压强度显著低于 Sham 组和去势 4 个月组 ;而 3 组之间的皮质骨最大抗弯曲载荷差异却无显著性(P 值均小于 0.05)。在相同条件下重建三维图像可以直观地显示出去势 12 个月后 ,绵羊腰椎及股骨颈的骨小梁密度及粗细程度均明显低于对照组(图 2、3)。

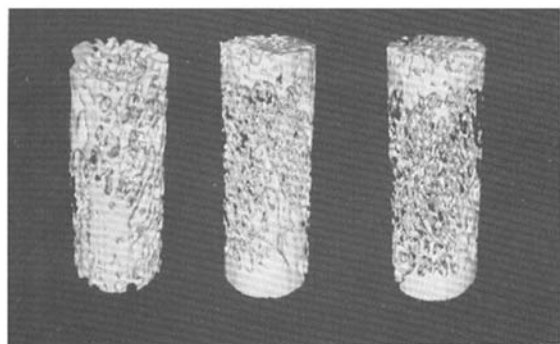


图 2 假手术组(左)与去势 4 个月组(中)及去势 12 个月组(右)腰椎松质骨的三维重建图像

图 2 显示,去势 12 个月组的骨小梁较其他两组明显稀疏,孔隙率增加,水平方向骨小梁减少,局部有较大的骨小梁空隙形成。



图 3 假手术组(左)与去势 4 个月组(中)及去势 12 个月组(右)股骨颈处松质骨的三维重建图像

4 讨论

4.1 OVX 对皮质骨的影响

由于 OP 对松质骨的影响远远大于对皮质骨的影响,因此,目前有关 OVX、激素等因素对皮质骨作用的研究较少。而内固定器械领域的研制与开发都是以正常骨质为研究模型,很少涉及在 OP 状态下,内固定材料与皮质骨之间组织学及生物力学的相互作用。随着人口老龄化的发展,骨质疏松后所致的四肢长骨骨折的发生机会也越来越多。因此,针对 OP 后皮质骨骨量学和生物力学变化的模型研究也逐渐获得重视^[2]。而且,随着各种关节假体的不断发展,其在 OP 状态下的功能表现也开始引起关注,如何在 OP 大动物模型的长骨上进行在体组织学和力学测试也成为骨科医师面临的问题。这些都要建立一种适合于内固定、假体研究的大型皮质骨 OP 动物模型。因此,国外学者在近年对 OP 与皮质骨组织结构和力学强度的影响进行了研究。

Ortoft 等^[8]研究发现,糖皮质激素可以抑制皮质骨的骨形成过程。而在去势后,激素可以明显加速大鼠股骨的力学强度下降的速度。Schorlemmer 等^[2]对 OVX 绵羊胫骨皮质骨的力学强度变化进行了研究。12 个月后,皮质骨力学强度(极限强度、弹性模量)并未发生明显改变。在本研究中,三点弯曲实验也未发现 3 组间皮质骨的力学特性差异有显著性。这可能与皮质骨代谢重建过程远长于松质骨有关。

4.2 OVX 建立骨质疏松模型的影响因素分析

本研究发现,骨质疏松模型建立需要去势 1 年以上,而文献报道,OVX 术后模型建立的时间长短不一:一些研究者在 OVX 后半年即观察到 BMD 明显下降^[5,9],而另外一些研究者则没有观察到类似的结果^[6,10,11]。其原因可能在于(1)动物品系和个体差异。国内学者多采用山羊进行 OP 建模,而国外学者多采用绵羊。由于动物种属间差异和对 OVX 耐受程度均可以影响 OVX 的效果。此外,去势时动物体重、年龄、是否处于哺乳期、孕期等条件的不同,也可以导致建模时间长短的不同。一般认为,采用老年雌性、处于生育哺乳期后的绵羊进行建模可以取得较好的效果。(2)去势季节的不同。绵羊的发情期处于秋冬季,期间激素水平上调,会对 OVX 效果产生一定影响。而且,羊的骨密度受季节影响较大,一般冬季时骨密度降低^[12]。人类 BMD 也会在 1 年内出现相同的变化^[13]。此外,去势时季节引起动物饲料的改变所导致体重发生变化,也会对建模有一定的影响^[14,15]。体重增加对 OP 具有一定的保护作用。本研究是在 5 月份对动物进行去势手术,在随后的 4 个月期间,动物饲料来源充足,动物体重有所增加,也在一定程度上干扰了 OVX 对 BMD 的作用。因此,本研究对 OVX 后的绵羊进行为期 1 年的观察,尽可能消除季节对 BMD 的影响,以明确 OP 模型建立的时间。(3)检测手段的不同。文献回顾发现,不同作者采用了不同检测手段(microCT、QCT、DXA、力学测试等)评估骨质疏松程度,因此导致建模时间的不同。而且,就目前而言,尚无动物骨质疏松的诊断标准,多数研究采用的是 BMD 出现显著下降为模型成功建立。本研究采用 BMD 作为检测指标,并根据人类骨质疏松诊断标准(-2.5 SD),认为应保证去势时间在 1 年以上,以确保模型的可靠性。

4.3 DXA 和 MicroCT 在 OP 模型中的评估作用

BMD 测量是确定 OP 模型建立的必要手段。双能 X 线吸收法测定仪(DXA)能精确测量脊柱和髌部

BMD, 因此已经被广泛用于评估人类及动物的 BMD 变化。但是, 在采用 DXA 进行 BMD 测定时, 必须进行严格的质量控制, 消除外部环境所产生的偏差。尤其是进行活体动物测量时, 动物体位的轻微变化会产生伪影, 导致实验结果的偏差。因此, 在本研究中, 所有动物均在麻醉状况良好的情况下进行脊柱正位的 BMD 测定, 在离体标本情况下测定股骨各部位的 BMD, 以最大限度地消除伪影, 减少实验误差的产生。BMC、BMC/W 与 BMD 相同, 均是评估 OP 的指标。在本研究中, BMD 的数据的标准差明显低于 BMC、BMC/W, 这说明在骨密度测定时, BMD 是更稳定的实验指标。由于 BMD 可以反映 BMC、BMC/W 的变化情况, 并且更具有稳定性和可比性, 因此, 在 OP 模型的评估中, 应首选该指标, 以利于群组间比较和正常值的建立。

由于设计 DXA 时人为地将扫描部位感兴趣区 (ROI) 内的组织分为可吸收 X 线组织和不可吸收 X 线组织两种, 而实际上 ROI 骨骼部位至少含有骨组织、红黄骨髓、骨外肌肉以及脂肪 4 种成分, 这些都可吸收 X 线, 因而也会导致骨密度测量不准确 (增加或降低), 产生精确度误差。Bolotin 等^[16, 17]报道即使 ROI 骨外软组织均质且均匀分布, DXA 误差仍可能超过 $\pm 20\%$, 在绝经后妇女、老年人、低骨量及骨质疏松个体中, 骨密度测量的精确度误差甚至可达 $20\% \sim 30\%$ 。此外, 单纯依赖 DXA 测定的腰椎 BMD 降低即认定建立了 OP 动物模型并不全面。Hahn^[18]的微构筑理论认为, 除骨量因素外, 骨小梁的稳定性还取决于其三维构筑及小梁间的联结程度。因此, 骨质疏松症的病理学改变包括质和量两方面。量变主要体现在 BMD 的下降, 而质变主要表现在骨小梁的生长状况、骨矿化程度、骨质的堆积范围、微损伤等区域性组织形态学改变, 如小梁骨体积下降, 骨小梁断裂、稀疏。国外学者目前也开始将 MicroCT 引入到 OP 的评估方面^[19, 20]。它能提供被扫描层面内密度分布的客观定量信息, 具有良好的密度分辨率, 并可以通过软件在三维空间观察骨标本的 BMC 和微结构。因此, 本研究中也采用 MicroCT 对椎体及股骨远近端的松质骨进行了重建分析, 直接观察骨小梁形态、结构及三维构筑以评估 OVX 对骨小梁的作用。结果表明, 去势 12 个月组的松质骨骨小梁数量、连接率及粗细程度均明显低于对照组。而去势 4 个月后, 松质骨的微观结构参数较假手术组差异无显著性。

4.3 生物力学测试

在对骨质进行 BMD 和 MicroCT 检测后, 本研究还对松质骨及皮质骨进行了生物力学的检测, 以期完成对 OP 模型动物的“影像学检测-形态性观察-功能学测试”的完整评估过程。松质骨由于其多孔性, 因此其抗压缩的应力-应变曲线存在一种特殊的特点。松质骨在承受压力负荷最早期可以出现弹性应变随后逐渐屈服。随着负荷增加松质骨内骨小梁开始出现断裂并填充松质骨间隙, 松质骨屈服, 应力下降, 曲线出现第 1 个峰值; 当松质骨内的大多数孔洞被碎裂的骨小梁碎屑填充, 松质骨抗压能力提高, 应力再次增加。通过对立方体 (股骨髁) 或者圆柱体 (椎体) 松质骨样本进行轴向加压的测试, 我们对松质骨机械强度进行了测试。研究结果表明, 松质骨的力学强度与 BMD 和骨小梁微观结构的变化具有一致性。但是, 3 组皮质骨的三点弯曲实验却未发现差异有显著性。这可能与皮质骨代谢重建过程远长于松质骨有关。

综上所述, 成年雌性绵羊在行去势手术 1 年后, 其腰椎和股骨远近端的松质骨 BMD 明显下降, 骨小梁的三维结构较对照组骨质改变显著, 其力学性能也有明显降低, 而去势 4 个月却未发现此结果。因此, 在建立绵羊 OP 模型时, 其去势时间应当在 1 年以上, 以确保模型的成功。

【参 考 文 献】

- [1] Newton BI, Cooper RC, Gilbert JA, et al. The ovariectomized sheep as a model for human bone loss. *J Comp Pathol*, 2004, 13(4): 323-326.
- [2] Schorlemmer S, Ignatius A, Claes L, et al. Inhibition of cortical and cancellous bone formation in glucocorticoid-treated OVX sheep. *Bone*, 2005, 37: 491-496.
- [3] 贺颖, 孙晓村, 陈槐卿, 等. 去卵巢山羊腰椎骨计量学指标的变化. *中华妇产科杂志*, 2003, 38(7): 405-408.
- [4] 李良, 陈槐卿, 陈孟诗, 等. 建立骨质疏松山羊模型初探. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(2): 12-16.
- [5] 李亚男, 刘洪臣, 倪紫砚, 等. 绵羊绝经后骨质疏松动物实验模型的建立. *口腔颌面修复学杂志*, 2000, 4(2): 75-77.
- [6] 刘宏建, 杜靖远, 刘辉. 绝经后骨质疏松症山羊模型的建立及其意义. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(10): 1266-1267.
- [7] Mitton D, Rumelhart C, Hans D, et al. The effect of density and test conditions on measured compression and shear strength of cancellous bone from the lumbar vertebrae of ewes. *Med Eng Phys*, 1997, 19: 464-474.
- [8] Ortoft G, Oxlund H. Qualitative alterations of cortical bone in female rats after long-term administration of growth hormone and glucocorticoid. *Bone*, 1996, 18: 581-590.

- [9] Turner AS , Mallinckrodt CH , Alvis MR , et al. Dual-energy X-ray absorptiometry in sheep : experiences with *in vivo* and *ex vivo* studies. *Bone* , 1995 , 17 (4 Suppl) : 381-387.
- [10] Chavassieux P , Garnero P , Duboeuf F , et al. Effects of a new selective estrogen receptor modulator on cancellous and cortical bone in ovariectomized ewes : a biochemical , histomorphometric and densitometric study. *J Bone Miner Res* 2001 , 16 (1) : 89-96.
- [11] Lill CA , Fluegel AK , Schneider E. Effect of ovariectomy , malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep : a pilot study. *Osteoporos Int* 2002 , 13 (6) : 480-486.
- [12] Mosekilde Li , Weisbrode SE , Safran JA , et al. Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary calcium restriction and ovariectomy in Sinclair S-1 minipigs : a pilot study. *J Bone Miner Res* , 1993 , 8 : 1311-1314.
- [13] Rosen CJ , Morrison A , Zhou H. Elderly women in northern New England exhibit seasonal changes in bone mineral density and calciotropic hormones. *J Bone Miner Res* , 1994 , 25 : 83-92.
- [14] Turner AS , Mallinckrodt CH , Alvis MR , et al. Dose response effects of estradiol implants on bone mineral density in ovariectomized ewes. *Bone* , 1995 , 17 : 421-427.
- [15] Turner As , Alvis M , Myers W , et al. Changes in bone mineral

density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. *Bone* , 1995 , 17 : 396-402.

- [16] Bolotin HH , Sievanen H. Grashius JL , et al. Inaccuracies inherent in patient-specific DXA bone mineral density measurements : comprehensive phantom-based evaluation. *J Bone Miner Res* , 2001 , 16 : 417-426.
- [17] Bolotin HH , Sievanen H. Inaccuracies inherent in dual energy X-ray absorptiometry *in vivo* bone mineral density can seriously mislead diagnostic/prognostic interpretations of patient-specific bone fragility. *J Bone Miner Res* 2001 , 16 : 799-805.
- [18] Hahn M , Vogel M , Pompesivs-Kempa M , et al. Trabecular bone pattern factor : a new parameter for simple quantification of bone micro architecture. *Bone* , 1992 , 13 : 327-340.
- [19] Sato M , Westmore M , Ma YL , et al. Teriparatide [PTH (1-34)] strengthens the proximal femur of ovariectomized nonhuman primates despite increasing porosity. *J Bone Miner Res* , 2004 , 19 (4) : 623-629.
- [20] Borah B , Gfoss GJ , Dufregne TE , et al. Three-dimensional microimaging (microMRI and microCT) , finite element modeling and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis. *Anat Rec* , 2001 , 265 : 101-110.